

На правах рукописи

Никиташина Александра Дмитриевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО
ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ
ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ**

03.03.01 – физиология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на базе кафедры прикладной экологии Института экологии и географии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (Казань), лаборатории биофизики синаптических процессов ФГБУН «Казанский Институт биохимии и биофизики» КазНЦ РАН (Казань) и лаборатории химико-биологических исследований ФГБУН «Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова» КазНЦ РАН (Казань).

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Зобов Владимир Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ситдикова Гузель Фаритовна

доктор биологических наук, профессор
Нигматулина Разина Рамазановна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

Защита состоится «2» апреля 2013 г. в «14.00» часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.28 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.ksu.ru

Автореферат разослан 1 марта 2013 г

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.м.н., профессор



Зефилов Т.Л.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Фермент ацетилхолинэстераза (АХЭ) - один из ключевых элементов, обеспечивающих нормальное функционирование холинергических синапсов за счет ограничения времени действия ацетилхолина, освобождающегося из нервного окончания. Ингибиторы АХЭ широко используются в медицинской практике для фармакологической коррекции синаптических дефектов, лежащих в основе болезни Альцгеймера, миастении Гравис и других форм патологической мышечной слабости (Birks, 2006; Brenner *et al.*, 2008). Показана их эффективность и при лечении глаукомы (Sakamoto *et al.*, 2010), атонии кишечника (Lee *et al.*, 2010), травматических повреждений мозга, алкоголизма, маниакально-депрессивных психозов, шизофрении, аутизма, расстройств сна и др. (Cumings, 2000). Однако использование существующих антиАХЭ препаратов в медицинской практике осложняется одним недостатком, присущим всем без исключения ингибиторам – полным отсутствием избирательности в отношении фермента разных органов и тканей. Поэтому наряду с положительным (терапевтическим) действием, ингибиторы АХЭ всегда оказывают побочные эффекты (диарея, частое мочеиспускание, тошнота, рвота, абдоминальные боли, брадикардия, аритмия, повышенная бронхиальная секреция, повышенное слюноотделение, и т.д.), связанные преимущественно с гиперактивацией холинорецепторов вегетативной нервной системы (в основном, гладкой мускулатуры) (Прозоровский, Саватеев, 1976; Eddleston *et al.*, 2005; Pope *et al.*, 2005).

Вышеописанных недостатков были бы лишены ингибиторы АХЭ, способные оказывать целевой эффект в определенных органах и тканях. В частности, для терапии миастений различной этиологии перспективным представляется использование ингибиторов, более эффективных в синапсах скелетных (поперечнополосатых) мышц, по сравнению с гладкой мускулатурой. Однако вещества с подобными свойствами известны не были. Относительно недавно при исследовании нового класса ингибиторов АХЭ, синтезированных в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (под руководством проф. Резника В.С.) - алкиламмониевых производных 6-

Научным консультантом по всем аспектам, связанным с воздействием ингибиторов ацетилхолинэстеразы на синаптическую передачу возбуждения, работы является Петров К.А. (к.б.н., ст. науч. сотр. лаб. химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова)

метилурацила - впервые появились предпосылки говорить о том, что селективное ингибирование АХЭ в отдельных органах возможно. Так, было показано (Petrov *et al.*, 2006; Petrov *et al.*, 2009) что синапсы мышц, участвующих в дыхании, более устойчивы к действию одного из представителей данного класса (соединение №547) по сравнению с синапсами мышц конечностей. Описанные различия между дыхательной и локомоторной мышцами не проявлялись в присутствии традиционных ингибиторов холинэстераз – карбаматного (неостигмин) и фосфорорганического (армин) (Petrov *et al.*, 2011). Таким образом, соединение №547 может быть первым кандидатом на роль тканеспецифического ингибитора АХЭ.

Анализ механизмов избирательности действия соединения №547 показал, что частично она может объясняться активностью фермента бутирилхолинэстеразы, которая компенсирует ингибирование АХЭ (Petrov *et al.*, 2011). Однако полностью объяснить существующие различия «компенсаторной» ролью бутирилхолинэстеразы не удавалось. Таким образом, появились основания полагать о наличии иного механизма действия, обеспечивающего устойчивость дыхательной мускулатуры к действию соединения №547 по сравнению с локомоторными мышцами (Petrov *et al.*, 2011). Дальнейшее исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе различий чувствительности органов к соединению №547, несомненно, позволит повысить эффективность поиска и создания тканеспецифичных ингибиторов АХЭ.

В связи с тем, что абсолютное большинство побочных эффектов ингибиторов АХЭ связано с гиперактивацией гладкой мускулатуры, ответ на вопрос об эффективности соединения №547 (и других подобных соединений) в отношении гладких мышц представляет большой практический интерес.

Цель и основные задачи исследования:

Цель данной работы - исследование механизмов действия алкиламмониевых производных 6-метилурацила и их специфичности по отношению к АХЭ скелетной и гладкой мускулатуры.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

1. На основании анализа амплитудно-временных характеристик спонтанных постсинаптических ответов сравнить антихолинэстеразную эффективность соединения №547 в синапсах локомоторной (длинный разгибатель пальцев) и диафрагмальной мышц мыши.

2. Используя мышей, нокаутированных по разным видам холинэстераз, конкретизировать фермент (бутирилхолинэстераза, АХЭ, отдельные молекулярные формы АХЭ), ответственный за формирование устойчивости диафрагмальной мышцы к соединению №547.

3. Исследовать влияние физической нагрузки, приводящей к изменению соотношения молекулярных форм АХЭ, на эффективность соединения №547 в синапсах локомоторной (длинный разгибатель пальцев) мышцы крысы.

4. Сравнить эффективность пиридоستيग्мина и соединения №547 в препаратах локомоторной (длинный разгибатель пальцев) и гладкой мускулатуры (мочевой пузырь, прямая кишка) крысы в опытах *ex vivo*.

5. На экспериментальной модели миастении Гравис проверить способность соединения №547 снижать выраженность признаков синаптического дефекта.

6. Провести скрининг новых синтезируемых алкиламмониевых производных с целью выявления наиболее активных ингибиторов ацетилхолинэстеразы. Сравнить эффективность отобранных соединений в препаратах локомоторной мышцы (длинный разгибатель пальцев) и гладкой мускулатуры (мочевой пузырь) крысы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ацетилхолинэстераза в синапсах диафрагмальной мышцы и в гладкой мускулатуре мочевого пузыря и кишечника крыс более устойчива к действию соединения №547 (ингибитор ацетилхолинэстеразы) по сравнению с ферментом синапсов локомоторной мышцы (длинный разгибатель пальцев). Степень устойчивости диафрагмальной мышцы к соединению №547 положительно коррелирует с наличием ацетилхолинэстеразы, заякоренной посредством PRiMA субъединицы.

2. Соединение №547 может рассматриваться как потенциальное лекарственное средство для коррекции синаптического дефекта, лежащего в основе миастении Гравис.

Научная новизна

В работе впервые проанализировано участие различных молекулярных форм АХЭ в формировании устойчивости синапсов дыхательной мускулатуры к алкиламмониевым производным 6-метилурацила. Впервые исследовано влияние производных 6-метилурацила на работу гладкой мускулатуры крысы. В работе показано, что эти соединения проявляют избирательность действия в

отношении скелетной мускулатуры, по сравнению с гладкой мускулатурой. Также было впервые показано, что представитель данного класса (соединение №547) способно устранять признаки мышечной слабости в экспериментальной модели миастении Гравис.

Научно-практическая ценность

Информация об особенностях строения АХЭ разных органов, как основы разной эффективности ингибирования производными 6-метилурацила, также как анализ зависимости «структура-активность» исследуемых соединений могут быть использованы для дальнейшего направленного синтеза органоспецифических ингибиторов АХЭ. Результаты данного исследования позволяют рассматривать алкиламмониевые производные 6-метилурацила как потенциальные лекарственные средства для лечения миастении Гравис и миастеноподобных состояний, лишенных целого ряда побочных эффектов, вызываемых гиперативацией холинорецепторов гладких мышц. Полученные данные используются при чтении лекций на кафедре прикладной экологии Института экологии и географии К(П)ФУ. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 12-04-32056-мол-а, 11-04-12102-офи-м, 11-04-01188-мол-а-вед, 12-04-33296, «Ведущая научная школа» НШ-64631-2010.7.

Личный вклад диссертанта

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных и оформление публикаций.

Достоверность полученных данных

Достоверность полученных данных подтверждается использованием достаточного объема экспериментальных исследований, постановкой и решением поставленных задач, статистической обработкой полученных результатов.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были доложены на следующих конференциях и съездах: международном XIII Биологическом симпозиуме студентов и аспирантов «SymBioSE 2009», VI международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2010, 2011 г.), XXIII международной зимней молодежной научной школе "Перспективные

направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2011), международной конференции молодых ученых «Биология-наука 21-го века!» (Пушино, 2012), международном съезде «The 11th International Meeting on Cholinesterases» (Казань, 2012), Съезде фармакологов России (Казань, 2012), международной конференции «Molecular mechanisms of synaptic transmission regulation» (Киев, 2012), ежегодных научных отчетных конференциях в Казанском Федеральном Университете и Институте органической и физической химии им. А. Е. Арбузова (2010, 2011, 2012).

Реализация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах (из списка ВАК).

Структура и объем диссертации

Диссертация объемом 113 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Список цитируемой литературы включает 125 источников, из них 16 - отечественных и 109 - иностранных авторов. Диссертация содержит 15 рисунков и 2 таблицы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на лабораторных беспородных крысах обоих полов весом 250-300гр., на мутантных мышах линии Delt1, (-/-)PRiMA, (-/-)ColQ, (-/-) BuChE. Опыты на мутантных мышах проводились в лаборатории Университета Рене Декарта (Париж), животные были любезно предоставлены Dr. Krejci (Universite Paris Descartes, Paris)

Электрофизиологические эксперименты проводили на изолированных мышечных препаратах диафрагмальной мышцы (диафрагма, *m. Diaphragma*) и длинном разгибателе пальцев (*m. EDL - Extensor Digitorum Longus*). Тензометрические исследования проводились на изолированных препаратах гладкой мускулатуры мочевого пузыря и прямой кишки крысы. Изолированные препараты помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал аэрированный карбагеном (O₂ 95%, CO₂ 5%, в течение 45 мин) раствор Рингера-Кребса следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.0, KCl – 5.0, CaCl₂ – 2.0, MgCl₂ – 1.0, NaHCO₃ – 11.0, NaH₂PO₄ – 1.0, глюкоза – 11.0, pH раствора поддерживали на уровне 7.2-7.4 при температуре 20±2С°. Соединение №547, а также другие представители производных

6-метилурацила были синтезированы в лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН. Ингибиторы АХЭ – пиридостигмин бромид и неостигмин (прозерин), а так же все реактивы для биохимических исследований приобретены в «Sigma-Aldrich».

Миниатюрные потенциалы (МПКП) и токи (МТКП) концевой пластинки регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники. МТКП регистрировали с использованием двухэлектродной фиксации мембранного потенциала мышечного волокна (на уровне -60 мВ). Анализировали амплитуду и постоянную времени спада (τ) сигналов. Для предотвращения спонтанных мышечных сокращений, вызванных ингибированием АХЭ, в омывающий мышцу раствор добавляли блокатор Na^+ -каналов тетродотоксин (0.1 $\mu\text{моль/л}$).

Сокращения препаратов гладкой мускулатуры регистрировали и измеряли с помощью компьютерной программы Virtual Chart Recorder 1024×768. Сокращения препаратов мочевого пузыря вызывали добавлением в омывающий препарат раствор ацетилхолина (100 $\mu\text{моль/л}$). Сокращения препаратов прямой кишки крысы вызывали стимуляцией электрическим сигналом с амплитудой 50 В, длительностью стимула 0,5 мс, частотой 50 Гц в течение 15 сек. Анализировали силу сокращений препаратов.

Биохимическое исследование ингибиторной активности новых синтезированных соединений проводилось на АХЭ эритроцитов человека («Sigma-Aldrich»). Регистрацию ферментативной реакции осуществляли согласно методу Элмана (Ellman *et al.*, 1961). Зависимость активности АХЭ от концентрации ингибитора оценивали с помощью уравнения Хилла (Hill), рассчитывая среднеэффективную концентрацию – IC_{50}

Экспериментальная аутоиммунная модель миастении Гравис

Экспериментальную аутоиммунную модель миастении Гравис (ЭАМГ) создавали по методике, описанной в статье Baggi *et al.*, 2003. Крыс (самки, возраст 6-8 недель) иммунизировали дважды (с интервалом в месяц) подкожным введением белка (последовательность 97-116 α -субъединицы АХР), растворенного в CFA/IFA (complete/incomplete Freund's adjuvant – стимулятор иммунного ответа). Развитие мышечной слабости диагностировали по наличию выраженного декремента амплитуды интегрального потенциала действия (ПД) мышц задних конечности крысы при высокочастотной стимуляции седалищного нерва (40 Гц, 200 стимулов), а также по уменьшенной, по сравнению с контрольной, амплитудой МТКП в «быстрой» мышце *m. EDL*.

Пиридостигмин и соединение №547 разводили в физиологическом растворе и вводили интраперитонеально.

Электрофизиологические эксперименты, индукция и диагностика экспериментальной миастении Гравис выполнены совместно с К.А. Петровым (к.б.н., ст. науч. сотр. лаб. химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние соединения №547 на амплитуду и постоянную времени спада МПКП в диафрагме мутантных мышей

В данной серии экспериментов стояла задача выявить фермент, ответственный за формирование устойчивости диафрагмальной мышцы (диафрагма) к действию соединения №547, используя мышей, нокаутированных по БухЭ, АХЭ и отдельным молекулярным формам АХЭ. Для этого предварительно было проверено, обладает ли диафрагма мышей «дикого типа» устойчивостью к действию соединения №547 по сравнению с локомоторной мышцей *m. EDL*.

Амплитуда МПКП в диафрагме мышей «дикого типа» составляла 0.96 ± 0.03 мВ, а постоянная времени спада – 2.00 ± 0.07 мс ($n=30$). Соединение №547 в диапазоне концентраций от 0.1 нмоль/л до 10 нмоль/л не оказывало эффекта ни на амплитуду, ни на длительность ответов (Рис. 1.). Характерные для ингибирования АХЭ признаки (увеличение амплитуды и длительности МПКП) наблюдались в концентрации 50 нмоль/л. Максимальный эффект проявлялся в концентрации соединения №547 100 нмоль/л. Амплитуда при этом составляла 1.76 ± 0.03 мВ, τ спада - 3.24 ± 0.16 мс.

Амплитуда МПКП в *m. EDL* мышей «дикого типа» составляла 0.63 ± 0.04 мВ, а постоянная времени спада – 2.15 ± 0.09 мс. Амплитуда МПКП достоверно увеличивалась уже в присутствии концентрации 0.5 нмоль/л ($p < 0.05$), максимальный рост амплитуды наблюдался при добавлении соединения №547 в концентрации 5 нмоль/л (Рис. 1.). Постоянная времени спада также максимально увеличивалась в концентрации 5 нмоль/л.

Таким образом, можно сделать вывод, что диафрагма мышей (как и диафрагма крыс) обладает устойчивостью к действию соединения №547.

В области нервно-мышечного контакта, помимо АХЭ, присутствует еще один фермент, способный гидролизовать ацетилхолин – бутирилхолинэстераза (БухЭ). Поскольку соединение №547 примерно на пять порядков менее эффективно в отношении

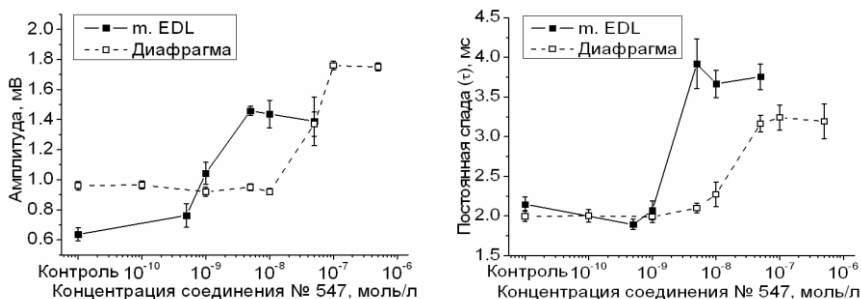


Рис. 1. Влияние соединения №547 на амплитуду и постоянную времени спада (τ) МПКП в диафрагме и *m. EDL* мышей «дикого типа», $n=30$

БуХЭ vs. АХЭ (Anikienko et. al., 2008), то можно предположить, что именно активность БуХЭ компенсирует ингибирование АХЭ. В серии экспериментов на диафрагме мутантных мышей без БуХЭ было показано, что отсутствие этого фермента не приводило к драматическим изменениям амплитудно-временных характеристик МПКП – амплитуда ответов соответствовала таковой у мышей «дикого типа» (0.99 ± 0.04 мВ), постоянная времени спада также достоверно не отличалась и составляла 1.84 ± 0.07 мс (Рис. 2 А, Б). Достоверное увеличение амплитуды и τ спада МПКП в диафрагме мышей без БуХЭ наблюдалось при добавлении соединения №547 в концентрации 10 нмоль/л ($p < 0.05$). В присутствии соединения №547 в концентрациях 50 и 100 нмоль/л амплитуда МПКП в диафрагме мутантов без БуХЭ росла аналогично таковой в «диком типе» с максимумом эффекта при 100 нмоль/л. Тогда как, максимальный рост постоянной времени спада МПКП наблюдался уже в концентрации 50 нмоль/л.

Поскольку эффект ингибирования АХЭ соединением №547 не наблюдался у мышей линии Dell (Рис. 2 В, Г), у которых в нервно-мышечных синапсах скелетных мышц полностью отсутствует АХЭ (Camp et al., 2008), то полученные факты свидетельствуют о том, что как «чувствительным», так и «устойчивым» к соединению №547 ферментом в синаптической щели диафрагмы, вероятно, является АХЭ, а фермент БуХЭ

Известно, что в нервно-мышечных синапсах АХЭ представлена двумя молекулярными формами, различающимися «якорной» субъединицей: PRiMA субъединица и ColQ субъединица. Нами была высказана гипотеза о том, что устойчивость синапсов диафрагмы к

действию соединения №547 может быть связана с особенностями строения одной из молекулярных форм АХЭ.

Нокаутирование по гену ColQ не приводило к столь сильному, как в случае полного отсутствия АХЭ, увеличению амплитудно-временных параметров МПКП, однако и амплитуда и постоянная времени спада достоверно отличались от значений в синапсах мышей

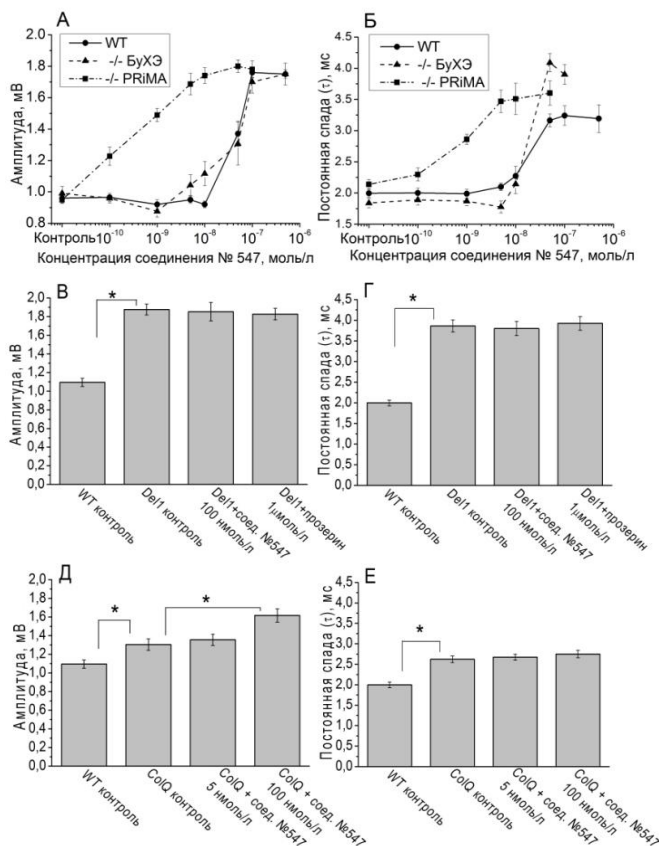


Рис. 2. Влияние соединения №547 на амплитуду и постоянную времени спада МПКП концевой пластинки в диафрагме мышей.

А, Б - «дикий тип» (WT), мутанты без БуХЭ (-/- БУХЭ), без PRiMA субъединицы (-/-PRiMA); В, Г - мутанты без АХЭ в синапсах (Del1); Д, Е - мутанты без ColQ субъединицы (-/-ColQ). n=30, * - достоверное отличие, p<0.05

«дикого типа» (амплитуда – 1.30 ± 0.06 мВ; τ спада – 2.62 ± 0.08 мс по сравнению с 0.96 ± 0.03 мВ и 2.00 ± 0.07 мс у «дикого типа», соответственно, $p < 0.05$) (Рис. 2. Д, Е).

Добавление соединения №547 в концентрации 5 нмоль/л (максимально эффективная для локомоторной мышцы *m. EDL*, но не вызывающая изменений в диафрагме мышей «дикого типа») не приводило к достоверному увеличению амплитуды длительности МПКП (1.36 ± 0.06 мВ и 2.67 ± 0.07 мс соответственно), тогда как концентрация 100 нмоль/л (максимально эффективная для диафрагмы «дикого типа») вызывала достоверное увеличение амплитуды ответов (до 1.61 ± 0.07 мВ, $p < 0.05$), не изменяя длительности (2.75 ± 0.09). Эти данные свидетельствуют о том, что в диафрагме ColQ мутантов также имеется АХЭ, устойчивая к соединению №547. Это позволяет сделать вывод о том, что устойчивый фермент заякорен не посредством ColQ субъединицы.

Амплитуда и постоянная времени спада МПКП в диафрагме мышей «дикого типа» и нокаутированных по второй «якорной» субъединице АХЭ (PRiMA) в контроле достоверно не отличались. Однако, отсутствие АХЭ, заякоренной посредством PRiMA, драматически изменяет чувствительность синапсов диафрагмы к соединению №547 (Рис. 2 А, Б). Уже в концентрации 0.1 нмоль/л соединение №547 вызывало достоверное увеличение амплитуды МПКП на 26% (1.23 ± 0.03 мВ, $p < 0.05$) и постоянной времени спада на 8% (2.14 ± 0.08 мс, $p < 0.05$) в диафрагме мутантных мышей, нокаутированных по гену PRiMA, тогда как в диафрагме мышей «дикого типа» эти параметры сохранялись на уровне контрольных значений. В диафрагме мышей без PRiMA-заякоренной АХЭ соединение №547 в концентрациях 1 нмоль/л и 10 нмоль/л вызывало увеличение амплитуды МПКП на 57 % и 83% и постоянной времени спада на 36 и 67% по отношению к контролю, соответственно (Рис. 2 А, Б.) мс). В диафрагме мышей «дикого типа» эти же концентрации не вызывали достоверных изменений амплитуды и постоянной времени спада МПКП. Начальные признаки ингибирования АХЭ в диафрагме мышей «дикого типа» наблюдались в присутствии соединения №547 в концентрации 50 нмоль/л, тогда как в диафрагме мутантов без PRiMA субъединицы при этой же концентрации было зафиксировано максимальное увеличение амплитуды и постоянной времени спада (на 90% и 64%, соответственно). Таким образом, по-видимому, именно PRiMA-заякоренная АХЭ является ответственной за формирование устойчивости к действию соединения №547 в диафрагме мышей.

Влияние соединения №547 на амплитуду и постоянную времени спада МТКП мышц крысы после функциональной нагрузки

Как было показано ранее, активность АХЭ селективно меняется при мышечной активности. Так, при тренировке лабораторных крыс на третбане, происходит значительное (на 70%) увеличение количества АХЭ, заякоренной посредством PRiMA, без изменения количества АХЭ, ассоциированной с ColQ (Fernandez, Hodges-Savola, 1996). Для того чтобы проверить, влияет ли изменение отношения PRIMA/ColQ АХЭ в *m.EDL* на чувствительность данной мышцы к соединению №547, было исследовано влияние ингибитора на амплитуду и постоянную времени спада МТКП в *m.EDL* «малоподвижных» контрольных крыс и крыс, тренированных на третбане в течение двух дней.

Исследования показали, что в контроле амплитуда МТКП в синапсах *m.EDL* составляла 4.66 ± 0.20 нА, а постоянная времени спада - 1.31 ± 0.07 мс. Нами были проверены две концентрации соединения №547: 0.3 нмоль/л (пороговая концентрация у контрольных животных), и наиболее эффективная концентрация - 5 нмоль/л (Рис. 3). У животных, подвергавшихся физической нагрузке, амплитуда МТКП была достаточно низкой по сравнению с контрольными животными и составляла 2.00 ± 0.20 нА, тогда как постоянная времени спада не отличалась от контрольных значений (Рис. 3). В пороговой концентрации 0.3 нмоль/л соединение №547 не вызывало увеличения амплитуды и постоянной времени спада МТКП в *m.EDL*.

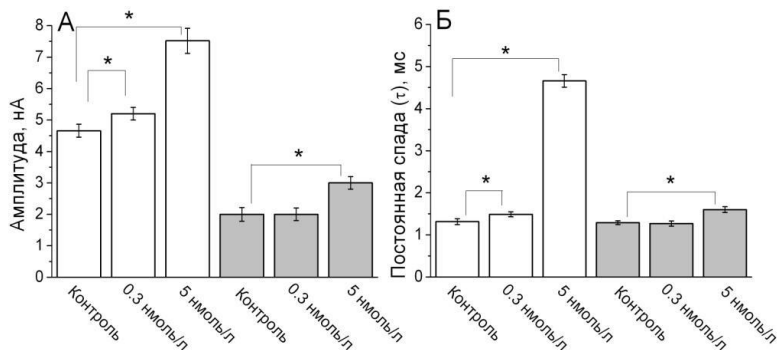


Рис. 3. Влияние соединения №547 на амплитуду (А) и постоянную времени спада (Б) МТКП *m. EDL* контрольных крыс (белые столбцы) и после физической нагрузки (бег на третбане; серые столбцы). * - достоверное отличие, $p < 0.05$

крыс после интенсивной физической нагрузки (бег на тротуаре) в отличие от контрольных животных, амплитуда и постоянная времени спада у которых увеличивалась на 11.6 и 13.5 % соответственно. Концентрация 5 нмоль/л, которая оказывала максимальный эффект на контрольных животных, после физической нагрузки стала оказывать значительно меньший эффект: амплитуда МТКП возросла на 50% по сравнению с 61,3% в контроле и составила 3.0 ± 0.20 нА (рис. 3), а постоянная времени спада – на 24% против 254.8% в контроле и была равна 1.6 ± 0.07 мс (Рис. 3). Таким образом, тренировка животных, которая ведет к увеличению количества PRiMA-заякоренной АХЭ, приводит к снижению чувствительности «быстрой» скелетной мышцы *m.EDL* к действию соединения №547. Эти данные также подтверждают наше предположение о связи устойчивости к действию соединения №547 с наличием PRiMA-заякоренной АХЭ.

Сравнение эффектов пиродостигмина и соединения № 547 в отношении скелетной и гладкой мускулатуры

В связи с тем, что абсолютное большинство побочных эффектов ингибиторов АХЭ связано с гиперактивацией холинорецепторов гладкой мускулатуры, особый интерес представляет тот факт, что согласно литературным данным значительная часть АХЭ гладкой мускулатуры заякорена в синапсах посредством PRiMA. Было высказано предположение о том, что гладкие мышцы могут быть более устойчивы к действию соединения №547 по сравнению с поперечнополосатыми (локомоторными) мышцами.

Было проведено сравнение эффективности применяющегося в клинике для лечения миастении Гравис ингибитора пиродостигмина и соединения №547 в отношении поперечнополосатой (локомоторной) мышцы *m. EDL* и гладкой мускулатуры мочевого пузыря и толстой кишки крысы.

В синапсах поперечнополосатых мышц ингибирование АХЭ в доза-зависимой манере увеличивает время жизни ацетилхолина, что приводит к линейному увеличению количества активируемых ацетилхолином мышечных холинорецепторов и выражается в увеличении амплитуды и длительности синаптических потенциалов и токов. Последующие этапы передачи возбуждения с нерва на мышцу (генерация и распространение ПД, сокращение мышечного волокна) не модулируются изменением количества ацетилхолина. Таким образом, для синапса поперечнополосатой мускулатуры рост амплитуды и длительности синаптических ответов является наиболее адекватным показателем изменения активности синаптической АХЭ. В случае гладкой мускулатуры эффект ацетилхолина опосредуется активацией

мускариновых рецепторов. Ингибирование АХЭ способно запускать целый комплекс процессов, приводящих к увеличению силы мышечных сокращений. Так, уровнем активации мускариновых рецепторов модулируются фазы деполяризации и реполяризации гладкомышечных ПД (Bonev and Nelson; 1993). Кроме того, увеличение времени жизни ацетилхолина приводит к росту продукции инозитол-3-фосфата, опосредующего выброс ионов кальция из внутриклеточных депо, что также увеличивает силу сокращений (Andersson et al., 1991). Таким образом, анализ только одного параметра не будет адекватно отражать эффективность ингибитора АХЭ в гладкой мускулатуре. По этой причине в качестве интегрального показателя эффективности ингибиторов АХЭ в гладкой мускулатуре традиционно используется оценка силы сокращений.

Амплитуда МТКП *m. EDL* в контроле составляла 4.41 ± 0.32 нА, а постоянная времени спада – 1.23 ± 0.06 мс ($n=30$). Пиридистигмин в концентрации 0.1 $\mu\text{моль/л}$ не вызывал характерные для ингибирования АХЭ изменения амплитуды и длительности МТКП. Добавление концентрации 0.5 $\mu\text{моль/л}$ приводило к достоверному увеличению амплитуды на 35 % (5.94 ± 0.10 , $p < 0.05$) (Рис. 4 А) и постоянной времени спада на 96 % (2.40 ± 0.05 мс, $p < 0.05$). Максимальное увеличение амплитуды (на 52 %) наблюдалось в концентрации пиридистигмина 1 $\mu\text{моль/л}$ (6.72 ± 0.30 нА), дальнейшее повышение концентрации не приводило к достоверному увеличению амплитуды. Максимальное повышение постоянной времени спада (на 233 %) наблюдалось при действии пиридистигмина в концентрации 100 $\mu\text{моль/л}$.

Сокращения препаратов мочевого пузыря в ответ на аппликацию ацетилхолина (100 $\mu\text{моль/л}$) составляли 2.9 ± 0.2 гр ($n=5$). Пиридистигмин в концентрации 0.1 $\mu\text{моль/л}$ не вызывал достоверного увеличения силы сокращения препаратов мочевого пузыря (107 ± 11 %) (Рис 4 Б). Однако, концентрация 0.5 $\mu\text{моль/л}$ давала эффект, близкий к максимальному (167 ± 11 %). Максимальная сила сокращений препаратов (на 85 ± 13 %) регистрировалась при добавлении пиридистигмина в концентрации 1 $\mu\text{моль/л}$. Дальнейшее повышение концентрации ингибитора не приводило к увеличению силы сокращений.

Сокращения препаратов прямой кишки крысы, вызванные эндогенным ацетилхолином, в ответ на стимуляцию полем составляли 3.23 ± 0.33 гр ($n=5$). Пиридистигмин повышал силу сокращений препаратов, начиная с концентрации 0.1 $\mu\text{моль/л}$ (на 15 ± 6 %).

Концентрация 0.5 $\mu\text{моль/л}$ вызывала значительный рост силы сокращений – на $100 \pm 23\%$, по сравнению с контролем. Максимальное увеличение силы сокращений наблюдалось в концентрации пиридоистигмина 1 $\mu\text{моль/л}$ и составляло $249 \pm 19\%$. Дальнейшее повышение концентрации ингибитора приводило к снижению силы сокращений препаратов гладкой мускулатуры. Таким образом, можно сказать, что пиридоистигмин вызывал характерные для ингибирования АХЭ признаки в скелетной и гладкой мускулатуре в одинаковых концентрациях и не проявлял избирательности действия.

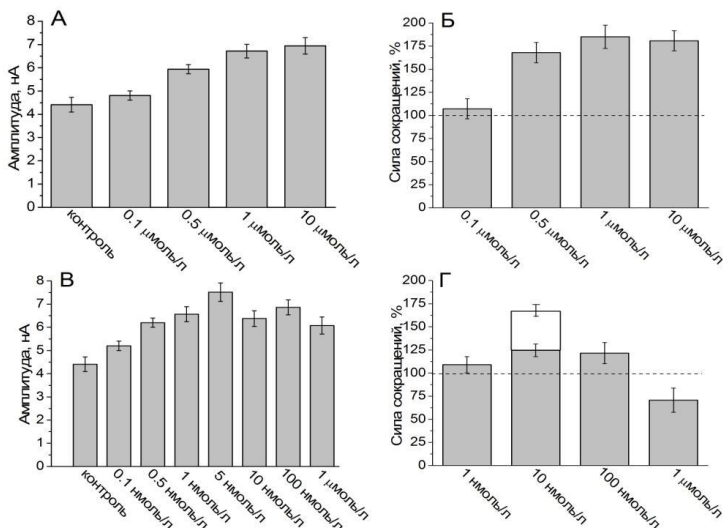


Рис. 4. Влияние различных концентраций пиридоистигмина и соединения №547 на амплитуду МТКП поперечнополосатой (локомоторной) мышцы *m. EDL* и силу сокращений препаратов мочевого пузыря крысы: А – пиридоистигмин, *m. EDL*; Б – пиридоистигмин, пузырь; В – соединение №547, *m. EDL*; Г – соединение №547, пузырь (незакрашенный столбец – пиридоистигмин 1 $\mu\text{моль/л}$ после соединения №547).

Соединение №547 увеличивало амплитуду и постоянную спада МТКП в поперечнополосатой (локомоторной) мышце *m. EDL* уже в концентрации 0.5 нмоль/л. Максимальное увеличение амплитуды и постоянной времени спада МТКП наблюдалось в концентрации 5 нмоль/л (Рис. 4 В). Дальнейшее повышение концентрации не приводило к росту этих параметров МТКП.

В опытах на препаратах мочевого пузыря крысы нами было показано, что соединение №547 начинало действовать в концентрации 1 нмоль/л, и вызывало достоверное увеличение силы сокращений

препаратов мочевого пузыря (109.0 ± 8.7 %) (Рис. 4 Г). При повышении концентрации соединения №547 наблюдалось дальнейшее увеличение силы сокращений (124.6 ± 6.8 % для 10 нмоль/л соединения №547, 121 ± 11.5 % для 100 нмоль/л). Добавление соединения №547 в концентрации 1 моль/л приводило к уменьшению силы сокращений до 70.7 ± 13.1 % от контрольных значений (Рис. 4 Г).

Таким образом, можно сделать вывод, что соединение №547 в концентрациях 1-100 нмоль/л оказывает антиАХЭ действие, проявляющееся в увеличении силы сокращений препаратов мочевого пузыря. Однако, даже максимальное увеличение силы сокращений, вызываемое соединением №547, было меньше, чем максимальный эффект, оказываемый пиридостигмином в концентрации 1 моль/л. Добавление пиридостигмина (1 моль/л) после максимально эффективной концентрации соединения №547 (10 нмоль/л) приводило к дальнейшему росту силы сокращения препаратов (Рис. 4 Г, незакрашенный столбец), что, по-видимому, свидетельствует о том, что в этих концентрациях соединение №547 ингибирует лишь часть АХЭ гладкой мускулатуры мочевого пузыря.

В следующей серии экспериментов нами было исследовано, как влияет соединение №547 на работу гладкой мускулатуры препаратов прямой кишки крысы. Добавление в омывающий препарат раствор концентрации 1 нмоль/л приводило к увеличению силы сокращений на 65 %. Повышение концентрации в десять раз (10 нмоль/л) вызывало максимальное увеличение силы сокращения препаратов – на 131 % по сравнению с контролем.

Добавление пиридостигмина (1 моль/л) после соединения №547 (10 нмоль/л) приводило к повышению силы сокращений препаратов, что, как и в случае с мочевым пузырем, свидетельствует по-видимому о неполном ингибировании АХЭ соединением №547 в данной концентрации. Таким образом, как и в случае экспериментов на препаратах мочевого пузыря крысы, на препаратах кишки соединение №547 проявляло максимальную эффективность действия в концентрации 10 нмоль/л, что в 2 раза больше концентрации, максимально эффективной для локомоторной мышцы.

Экспериментальная модель миастении Гравис

Исследования показали, что у здоровых животных в контроле при частоте стимуляции 40 Гц отношение амплитуды 200-го М-ответа к 1-му ($ПД_{200}/ПД_1$) составляло 95.021 ± 1.084 %, (декремент в контроле порядка 5%) (Рис. 5 А). После иммунизации крыс пептидом (аналогом основного иммуногенного участка мышечного холинорецептора) примерно у 75% животных диагностировали развитие ЭАМГ -

декремент в среднем составлял 33% (отношение PD_{200}/PD_1 равно $67.311 \pm 2.72\%$) (Рис. 5 Б). При внутрибрюшинном введении соединения №547 крысам с диагностированной ЭАМГ в дозе 0.004 мг/кг декремент повышался до 17% (отношение ответов равно $83.25 \pm 1.37\%$). Однако при двукратном увеличении дозы (0.008 мг/кг) наблюдалось восстановление декремента до уровня контрольных значений в 5% (отношение ответов равно $95.416 \pm 0.964\%$) (Рис. 5). Аналогичный результат был показан и для пиридоистигмина. Введение этого классического ингибитора в дозе 1 мг/кг также восстанавливало декремент амплитуд до контрольных значений (Рис. 5).

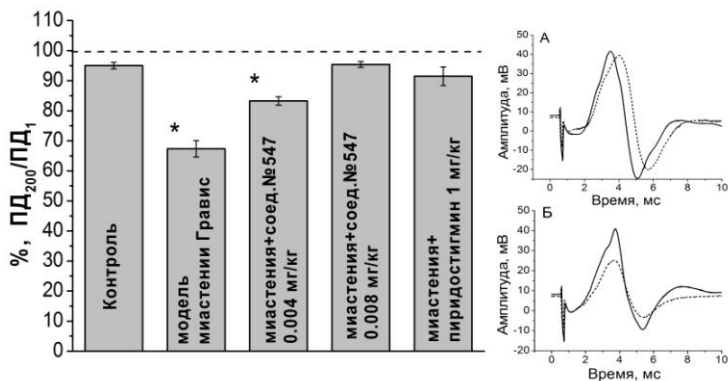


Рис. 5. Отношение амплитуды 200-го к 1-му М-ответу (PD_{200}/PD_1) мышц задних конечностей крыс при высокочастотной стимуляции (40 Гц) в контроле, при развитой ЭАМГ и после внутрибрюшинного введения соединения №547 в дозе 0.004 и 0.008 мг/кг. $n=3$, * - достоверное отличие по сравнению с контролем ($p<0.05$). Справа - миограмма двухсотого и первого М – ответов в контроле (А) и при ЭАМГ (Б).

Снижение плотности рецепторов при развитии миастении Гравис ведет к уменьшению амплитуды и длительности МТКП, при этом частота МТКП остается неизменной (Pachner, 1987). Нами было показано, что в *m.EDL* крыс с диагностируемой ЭАМГ (декремент амплитуд PD_{200}/PD_1 больше 5 %) амплитуда и постоянная времени спада МТКП были значительно меньше контрольных показателей - амплитуда на 40% (2.8 ± 0.2 нА) и постоянная времени спада на 36% (0.84 ± 0.03 мс) по сравнению с контролем. При внутрибрюшинном введении соединения №547 в дозе 0.008 мг/кг крысам с ЭАМГ наблюдалось восстановление амплитуды и постоянной времени спада МТКП практически до уровня контрольных значений (4.2 ± 0.2 нА; 1.20 ± 0.08 мс, соответственно).

Скрининг новых соединений – ингибиторов АХЭ

В рамках данной работы среди синтезируемых в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (лаборатории Химии нуклеотидных оснований, под руководством проф. Резника В.С.) соединений был проведен поиск новых ингибиторов АХЭ, представителей ряда алкиламмониевых производных 6-метилурацила. Проверены 19 новых соединений.

За исключением трех представителей (№ 12, 14, 15), все соединения проявляли антиАХЭ активность. Для одного вещества (соединения №7) была обнаружена избирательность в отношении локомоторной мышцы (*m. EDL*) по сравнению с гладкой мускулатурой мочевого пузыря крысы.

Так, в экспериментах на *m. EDL* соединение №7 вызывало характерное для ингибирования АХЭ увеличение амплитуды МТКП в концентрации 10 нмоль/л. При этом амплитуда составляла 145 % от контрольных значений. Увеличение концентрации до 100 нмоль/л не приводило к дальнейшему росту амплитуды, а концентрация 1000 нмоль/л соединения №7 вызывала достоверное падение амплитуды до 3.33 ± 0.15 нА. Увеличение постоянной времени спада МТКП в *m. EDL* наблюдалось в концентрации соединения №7 10 нмоль/л и составляло 248 % от контрольных значений (2.56 ± 0.09 мс).

В опытах на препаратах мочевого пузыря крысы нами было показано, что соединение №7 начинало действовать в концентрации 10 нмоль/л. Максимальная сила сокращения регистрировалась в присутствии соединения №7 в концентрации 1 моль/л и составляла 137.0 ± 9.3 %, что в 2 раза меньше максимального эффекта от пиридоستيмина. Как и в случае соединения №547, по-видимому, соединение №7 в проверенных концентрациях ингибирует лишь часть АХЭ. Таким образом, максимально эффективные концентрации соединения №7 на *m. EDL* и гладкой мускулатуре крысы различаются на два порядка, а значит данный представитель класса алкиламмониевых производных 6-метилурацила является еще более избирательным (чем соединение №547) ингибитором АХЭ поперечнополосатых мышц по сравнению с гладкой мускулатурой.

Можно сделать вывод, что органоспецифичность, по-видимому, не является уникальным свойством соединения №547 и при продолжении направленного скрининга можно надеяться на получение еще более эффективных органоспецифичных ингибиторов АХЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование было направлено на изучение возможности тканеспецифического ингибирования ацетилхолинэстеразы. Было показано, что представители нового класса ингибиторов АХЭ (алкиламмониевые производные 6-метилурацила) проявляют избирательность действия в отношении локомоторной мышцы m. EDL по сравнению с диафрагмальной мышцей и гладкой мускулатурой (мочевой пузырь, кишечник). Подобные свойства делают данный класс соединений перспективным для создания на их основе лекарств для лечения миастений различной этиологии с меньшими побочными эффектами на гладкой мускулатуре. Проведенный нами анализ позволил определить молекулярную форму АХЭ, обладающую устойчивостью к производным 6-метилурацила. Дальнейшее исследование молекулярных механизмов, обеспечивающих меньшую эффективность ингибирования АХЭ, ассоциированной с PRiMA субъединицей, позволит увеличить вероятность получения тканеспецифических ингибиторов АХЭ.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа амплитудно-временных характеристик спонтанных постсинаптических ответов было показано, что синаптическая АХЭ диафрагмальной мышцы мыши обладает устойчивостью к действию соединения №547 по сравнению с ферментом локомоторной мышцы (длинный разгибатель пальцев).
2. Активность фермента бутирилхолинэстеразы не вносит значительного вклада в формирование устойчивости синапсов диафрагмальной мышцы мыши к соединению №547.
3. Увеличение амплитуды и постоянной времени спада МПКП диафрагмальной мышцы в присутствии соединения №547 объясняется воздействием на АХЭ, поскольку аналогичные эффекты соединения №547 отсутствуют у мышей, нокаутированных по АХЭ в нервно-мышечных синапсах.
4. Чувствительность синапсов диафрагмальной мышцы к действию соединения №547 значительно выше у мутантных мышей без PRiMA «якорной» субъединицы АХЭ, чем у мышей «дикого типа».
5. Интенсивная физическая нагрузка, приводящая к увеличению количества АХЭ, ассоциированной с PRiMA, приводит к снижению чувствительности локомоторной мышцы (длинный разгибатель пальцев) к соединению №547.
6. Соединение №547 проявляет избирательность действия в отношении локомоторной мышцы (длинный разгибатель пальцев) по

сравнению с гладкой (мочевой пузырь, прямая кишка), тогда как пиридостигмин такой избирательностью не обладает.

7. Соединение №547 в дозе 0.008 мг/кг (1/125 LD₅₀) устраняет электрофизиологические признаки синаптического дефекта в экспериментальной модели миастении Гравис.

8. В результате скрининга выявлено новое производное 6-метилурацила (соединение №7), проявляющее избирательность в отношении локомоторной мышцы (длинный разгибатель пальцев) по сравнению с гладкой мускулатурой (мочевой пузырь).

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Petrov K., Yagodina L., Valeeva G., Lannik N., Nikitashina A., Rizvanov A., Zobov V., Bukharaeva E., Reznik V., Nikolsky E., Vyskocil F. (2011) Different sensitivities of rat skeletal muscles and brain to novel anti-cholinesterase agents, alkylammonium derivatives of 6-methyluracil (ADEMS). *British. J. Pharmacol*, 163, 732–744.
2. Korochkina M., Nikitashina A., Khaybullin R., Petrov K., Strobykina I., Zobov V., Kataev V. (2012) Unfolded and macrocyclic ammonium derivatives of diterpenoids steviol and isosteviol having choline moieties. Synthesis and inhibitory activities toward acetylcholine- and butyrylcholinesterases. *Med. Chem. Commun.*, 3, 1449 - 1454.
3. Petrov K., Malomouzh A., Kovyazina I., Krejci E., Nikitashina A., Proskurina S., Nikolsky E. (2013) Regulation of acetylcholinesterase activity by nitric oxide in mammalian neuromuscular junction via NMDA receptor activation. *European Journal of Neuroscience*, 37, 181-189.
4. Никиташина А.Д., Зобов В.В., Ленина О.А. 1,3-bis-[5-(diethyl-o-nitrobenzylammonio)pentyl]-6-methyluracildibromide selective influence on isolated muscles of different functional type // 13 ежегодный симпозиум для студентов Европы по биологии «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of borders», Казань, 2009. 129 с.
5. Никиташина А.Д., Ягодина Л.О., Петров К.А., Зобов В.В., Резник В.С., Никольский Е.Е. Алкиламмониевые производные 6-метилурацила - тканеспецифичные ингибиторы ацетилхолинэстеразы // Шестой Международный Междисциплинарный Конгресс Нейронаука для медицины и психологии, Судак, Украина, 2010. С. 216-217
6. Никиташина А.Д., Ягодина Л.О., Петров К. А., Зобов В. В., Резник В. С., Никольский Е. Е. Влияние соединения №547 на активность ацетилхолинэстеразы мышечной и нервной ткани // XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2011. С. 12.

7. Зобов В.В., Петров К.А., Никиташина А.Д., Рогожин А.А., Резник В.С. Тканеспецифичные ингибиторы ацетилхолинэстеразы и миастения Гравис // Седьмой Международный Междисциплинарный Конгресс Нейронаука для медицины и психологии, Судак, Украина, 2011. С. 185-186
8. Никиташина А.Д., Петров К.А., Никольский Е.Е., Зобов В.В., Резник В.С. Создание новых ингибиторов ацетилхолинэстеразы как потенциальных лекарственных средств для лечения симптомов патологической мышечной слабости // Международная конференция молодых ученых «Биология-наука 21-го века», Пущино, 2012. С. 431-432.
9. Petrov K., Nikitashina A., Reznik V., Zobov V., Semenov V., Galyametdinova I., Nazarov N., Kovyazina I., Bukharaeva E., Vyskocil F., Nikolsky E. Tissue-specific inhibitors of acetylcholinesterase for treatment of myasthenia Gravis // The 11th International Meeting on Cholinesterases, Казань, 2012. С. 126.
10. Petrov K., Malomouzh A., Kovyazina I., Krejci E., Nikitashina A., Proskurina S., Nikolsky E.. Nitric oxide is an endogeneous regulator of acetylcholinesterase activity in mammalian neuromuscular junction // The 11th International Meeting on Cholinesterases (Казань, 2012). С. 127.
11. Никиташина А.Д., Петров К.А., Никольский Е.Е., Зобов В.В., Резник В.С. Направленный поиск ингибиторов ацетилхолинэстеразы, как потенциальных лекарственных средств для лечения миастении Гравис и ряда врожденных миастенических синдромов // Съезд фармакологов России (Казань, 2012).
12. Nikitashina A.D., Petrov K.A., Reznik V. S., Semenov V. E., Galiametdinova I. V., Bukharaeva E. A, Nikolsky E.E. Investigation of the new tissue-specific inhibitors of acetylcholinesterase for the treatment of myasthenia gravis // Symposium "Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation" (Киев, 2012). С. 23.
13. Petrov K., Malomouzh A., Kovyazina I., Krejci E., Nikitashina A., Proskurina S., Nikolsky E. Endogeneous regulation of acetylcholinesterase activity in mammalian neuromuscular junction by nitric oxide // Symposium "Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation" (Киев, 2012). С. 25.

Выражаю искреннюю благодарность к.б.н, старшему научному сотруднику лаб. химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова Петрову Константину Александровичу за оказанное содействие при выполнении данного исследования .